

Дембицкая Юлия Владимировна

**Регуляция синаптической передачи активацией постсинаптических
рецепторов, астроглией и внеклеточным матриксом мозга**

Специальность 03.03.01 — Физиология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Казань – 2015

Научный руководитель: **Семьянов Алексей Васильевич**,
доктор биологических наук, директор института
биологии и биомедицины ННГУ имени Н.И.
Лобачевского.

Никольский Евгений Евгеньевич

доктор медицинских наук, академик РАН, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.

Защита состоится «31» марта 2015 года на заседании диссертационного совета Д 212.081.28 при Казанском Федеральном Университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Accep

Т.А. Аникина

Общая характеристика работы

Постановка проблемы и ее актуальность. Изучение механизмов функционирования нервной системы является одним из приоритетных направлений физиологии, поскольку имеет отношение к пониманию природы таких фундаментальных физиологических процессов как память, обучение и сознание. Кроме того изучение особенностей работы нервной системы при различных патологических состояниях (деменция, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, последствия травм спинного мозга) позволит разработать новые патогенетические принципы их терапии. Важнейшим типом клеток нервной системы являются нейроны, осуществляющие функции восприятия, передачи, обработки и хранения информации в мозге. Кроме того мозг включает в себя также клетки нейроглии (астроглия, олигодендроциты, радиальная глия, микроглия, шванновские клетки), кровеносные сосуды и внеклеточный матрикс мозга (ВКМ). Очевидно, что нормальная работа нервной системы возможна лишь при условии эффективного функционирования синаптических структур, обеспечивающих межнейрональную передачу информации.

Одним из путей, обеспечивающих регуляцию передачи информации через синапсы химического типа, является модуляция процесса высвобождения нейротрансмиттеров. Высвобождение некоторых веществ из постсинапса способно воздействовать на пресинаптические рецепторы, меняя эффективность высвобождения нейротрансмиттера. Кроме того локальное изменение ионных градиентов также может участвовать в модуляции высвобождения нейротрансмиттера. Это связано с малой величиной синаптической щели в центральной нервной системе - 20 нм, в которой синаптические токи, включая активацию AMPA, NMDA рецепторов, могут приводить к существенному локальному изменению мембранного потенциала. Наличие K^+ проводимости у AMPA, NMDA рецепторов снижает деполяризацию мембраны, что затрудняет достижения порога генерации

потенциала действия и увеличивает энергетические затраты при химической синаптической передаче. Однако K^+ проводимость AMPA и NMDA рецепторов может иметь особую физиологическую роль в модуляции высвобождения нейротрансмиттера. Локальное увеличение K^+ может вызывать деполяризацию пресинаптического окончания и повышать вероятность высвобождения нейротрансмиттера. Несмотря на важность изучения причин наличия K^+ проводимости у AMPA, NMDA рецепторов, этот вопрос оставался неисследованным.

Неизученными остаются еще многие аспекты функционирования глиальных клеток. Их роль в нервной системе долгое время считалась пассивной, направленной на поддержание жизнедеятельности нейронов через обеспечение ионного гомеостаза, концентрации нейротрансмиттера в синаптической щели, с участием в формировании гемато-энцефалического барьера, регуляцией локального кровотока, обеспечением энергетическими субстратами и участием в выделении трофических факторов. Однако недавние исследования все больше свидетельствуют о более активной роли астроцитов в синаптической передаче, связанной с высвобождением нейромодуляторных веществ таких, как D-серин, глицин, АТФ и глутамат. Противоречивость результатов о способности астроцитов отвечать на синаптическую активацию, а также их возможная значимая роль в патогенезе ряда заболеваний нервной системы и старении, делает этот вопрос требующим более глубокого изучения с применением более совершенных экспериментальных и аналитических методик.

Другим мало изученным компонентом нервной системы являются молекулы ВКМ, которые занимают пространство между нейронами и глиальными клетками в мозге. Основными компонентами ВКМ являются гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат протеоглики, соединительные белки, стабилизирующие структуру комплекса гиалуроновой кислоты, хондроитин сульфата и гликопротеинов: тенасцин-Р и реелин. Различные

компоненты ВКМ участвуют в регуляции синаптической пластичности посредством ряда механизмов. Удаление гиалуроновой кислоты уменьшает уровень долговременной потенциации (ДВП), и усиливает латеральную диффузию AMPA рецепторов. Реелин способен увеличивать активность NMDA рецепторов и облегчать возникновение ДВП *in vivo*. Снижение экспрессии тенасцина-Р приводит к снижению торможения и уровня ДВП. Хондроитин сульфат протеогликаны (ХСПГ) определяют критический период в развитии зрительной коры мышей. Удаление ХСПГ приводит к снижению уровня ДВП в пирамидных нейронах области CA1 гиппокампа, однако возможные клеточные механизмы этого процесса не были известны. Поскольку работы по восстановлению нейрональных связей выполняют комплексно с удалением ВКМ мозга, то такая обработка может оказывать негативное влияние на обучение и память и требует детального изучения. Важным вопросом остается изучение влияния ВКМ на астроглию, поскольку оно может оказывать влияние на синаптическую передачу. Поэтому, изучение взаимодействия пресинаптического, постсинаптического окончаний, астроглии и внеклеточного матрикса мозга является актуальной для понимания физиологии и патофизиологии нервной системы, важной для разработки методов терапевтических воздействий в лечении нейродегенеративных заболеваний, травм спинного и головного мозга.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы - изучение механизмов взаимодействия пресинаптического, постсинаптического окончаний, астроглии и внеклеточного матрикса мозга в синаптической передаче. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи** по изучению:

1. роль активации постсинаптических NMDA рецепторов в модуляции высвобождения нейротрансмиттера в глутаматергических синапсах;
2. зависимость Ca^{2+} активности в астроцитах от синаптической

активации и присутствия глутамата;

3. влияние ВКМ на уровень долговременной потенциации в глутаматергических синапсах;

4. влияние ВКМ на глутаматергическую, ГАМКергическую синаптические передачи и возбудимость нейронов;

5. влияние ВКМ на Ca^{2+} активность в астроцитах.

Научная новизна работы

Данная работа является важным звеном в понимании ключевых аспектов взаимодействия пресинаптического, постсинаптического окончаний, астроглии и внеклеточного матрикса мозга в синаптической передаче:

1. Впервые показано, что накопление K^+ в синаптической щели, выходящего через NMDA рецепторы, вызывает потенциацию высвобождения глутамата.

2. Использован новый подход анализа распределения Ca^{2+} активности в целом астроците для изучения зависимости от синаптической активности с использованием генетически-закодированного Ca^{2+} индикатора.

3. Впервые показано, что глутамат, в том числе высвобожденный при синаптической активности, действуя на метаботропные рецепторы, увеличивает максимальную площадь Ca^{2+} событий в астроцитах, не влияя на их частоту

4. Найден двунаправленный механизм влияния ВКМ на ДВП: возникновение потенциации в глутаматергических синапсах, связанной с активацией ROCK-киназы, и снижение возбудимости нейронов через увеличение активности SK каналов.

5. Проведено первое исследование влияния ВКМ на Ca^{2+} активность в астроцитах.

Научно-практическая значимость.

Теоретическое значение данной работы состоит в понимании фундаментальных, ранее не изученных, факторов влияющих на синаптическую передачу, таких как активация постсинаптических рецепторов, взаимодействие с астроглией и ВКМ. В данной работе используется новый подход к изучению Ca^{2+} событий на соме и в отростках астроцитов с высоким разрешением и использованием генетического индикатора. Примененный анализ распределения Ca^{2+} событий важен с точки зрения моделирования Ca^{2+} событий и синаптической передачи. *Практическое значение* диссертации заключается в возможности применения блокаторов SK каналов и ROCK киназы для терапевтических воздействий для восстановления травм спинного мозга и нарушенных нейрональных связей. Это поможет компенсировать эффект снижения ДВП при удалении ВКМ для избежания побочных эффектов при лечении. Изучение Ca^{2+} сигнализации в астроглии так же имеет значение для медицины, поскольку астроглия вовлечена в развитие нейродегенеративных заболеваний и процессы старения.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора.

Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Автор принимал непосредственное участие в постановке, реализации задач, обсуждении результатов, их описании и подготовке к публикации.

Основные положения, выносимые на защиту.

Синаптическая передача является сложным процессом, в регуляции которого участвуют: (1) активация постсинаптических NMDA рецепторов; (2) астроглия через активацию метаботропных рецепторов глутамата; (3) внеклеточный матрикс мозга, регулирующий активность SK-каналов и ROCK-киназы.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывали были представлены на международных и региональных конференциях, в число которых входят: международная конференция Society for Neuroscience meeting

(Вашингтон, США, 2014), международная конференция 9th FENS Forum of Neuroscience (Милан, Италия, 2014), международная конференция Society for Neuroscience meeting (Сан Диего, США, 2013), научная школа OIST Computational Neuroscience Course 2014 (Окинава, Япония, 2014), международный симпозиум «Прогресс и перспективы исследований внеклеточного матрикса мозга». (Нижний Новгород, Россия) 2012 г., 2013 г., 2014 г., конференция «BSI Retreat 2012».(Каруизава, Япония, 2012).

Публикации. Результаты данного исследования опубликованы в 3 научных изданиях, рекомендованных ВАК, в трудах 9 международных и региональных конференций, 3 учебно-методических пособиях.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, теоретической части, практической части состоящей из трех глав, заключения, библиографического списка литературы (231 наименование). Общий объем текста работы – 154 страницы машинописного текста. Количество рисунков – 40.

1. Материалы и методы исследования

1.1. Объекты исследования. Эксперименты проводились на пирамидных нейронах области CA1 срезов гиппокампа мышей линии C57BL/6J, возрастом 28-35 дней. Инкубация срезов проводилась при постоянной температуре (34°C) для экспериментов по изучению роли K^+ и Ca^{2+} активности в астроцитах. Для исследования роли ВКМ инкубация срезов проводилась при постоянной температуре (37°C): контроль (0,2% альбумина), а при удалении ВКМ ферментом хондроитиназой ABC (0,2% альбумина, 0.2U/мл хондроитиназы ABC (ХАВС)). Для контроля удаления ВКМ проводился *иммуногистохимический анализ*.

1.2. Электрофизиология. Все электрофизиологические записи проводились при температуре 34°C. Для электрической стимуляции

использовались стальные биполярные электроды, а для электрофизиологической регистрации в режиме патч-кламп - стеклянные микроэлектроды сопротивлением 3-5 МΩ. Во время записи полевых ВПСП (пВПСП) ДВП индуцировалась с помощью двух протоколов: 1) STDP протокол (*от англ. spike-timing-dependent plasticity*); 2) тетаническая стимуляция (nonSTDP).

Для изучения роли K^+ на потенциацию высвобождения нейротрансмиттера проводилось измерение K^+ тока методом патч-клампа в астроцитах области *str. radiatum*, при стимуляции коллатералей Шаффера (КШ) и антидромной стимуляции (АД) аксонов в области *str. oriens*. Измерение потенциации возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) проводилось при стимуляции КШ (5 стимулов, 50 имп/с) при использовании внутриклеточных растворов: 1) на основе KCH_3SO_3 ; 2) на основе N-метил – D-глюкозамина (для замены K^+) - $NMDG^+CH_3SO_3$; 3) на основе KCH_3SO_3 с добавлением iMK801 (внутриклеточный блокатор открытых NMDA рецепторов).

Для изучения роли ВКМ в синаптической передаче с помощью метода патч-кламп проводились: 1) регистрация долговременной потенциации, в контрольных условиях, при блокировании SK каналов с помощью апамина (1нМ), и при блокировании SK каналов и ингибировании ROCK-киназы с помощью Y-27632 (10 мкМ); 2) измерение параметров глутаматергической синаптической передачи, в присутствии PTX (100 мкМ), (S)-MCPG (200 мкМ), CGP (5 мкМ) блокирующих ГАМК_A, mGluRs, ГАМК_B, соответственно; 3) измерение параметров ГАМКергической синаптической передачи, в присутствии NBQX (25 мкМ), D-APV (50 мкМ), (S)-MCPG (200 мкМ), CGP (5 мкМ) блокирующих AMPA, NMDA, mGluRs, ГАМК_B, соответственно; 4) измерение клеточной возбудимости при блокировании SK каналов с помощью 1нМ апамина, и при блокировании BK каналов с помощью паксиллина (5 мкМ), а также в присутствии NBQX (25 мкМ), D-APV (50 мкМ), PTX (100 мкМ),

блокирующих AMPA, NMDA, ГАМК_A, соответственно; 5) запись K⁺ тока через SK каналы, выделяемого с помощью апамина (1нМ). Для каждого эксперимента использовался соответствующий внутриклеточный раствор.

1.3. Двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия и фотостимуляция глутаматом. Метод применялся для изучения флуктуаций концентрации кальция в соме и отростках астроцитов. Использовались срезы гиппокампа мышей линии GCaMP2 возрастом 2-4 месяца, экспрессирующих в астроцитах белок – Ca²⁺ индикатор окрашивались сульфородаминоом 101 (100 нМ). Эксперименты проводились на микроскопе Nikon Eclipse, оснащенном фемтосекундным импульсным инфракрасным лазером Coherent Chameleon XR (890 нм). Фотостимуляция связанного глутамата (400 мкМ во внеклеточном растворе) проводилась лазером длиной волны 405 нм длительностью 5 мс.

1.4. Анализ данных и статистическая обработка. Анализ электрофизиологических и данных имиджинга проводились в программах Clampfit, Matlab 2012b, Origin 8, Python. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Различия средних рассчитывались с помощью теста Манна-Уитни и теста Вилкоксона и считались достоверными при p<0.05.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Модуляция высвобождения нейротрансмиттера K⁺ выходящим при активации синаптических NMDA рецепторов

2.1.1. Роль NMDA рецепторов в синаптической пластичности.

Величина потенциации сравнивалась в контроле и в присутствии D-APV (50 мкМ) как угол наклона пВПСП для двух протоколов nonSTDP и STDP. Показано, что при применении nonSTDP протокола в контроле возникает ДВП, а в присутствии D-APV – нет (**Рис. 1 а**). В случае STDP протокола также в контроле возникает ДВП, а в присутствии D-APV – нет (**Рис. 1 б**). Таким

образом, активация NMDA рецепторов для синаптической пластичности в гиппокампе при STDP и nonSTDP типах индукции ДВП.

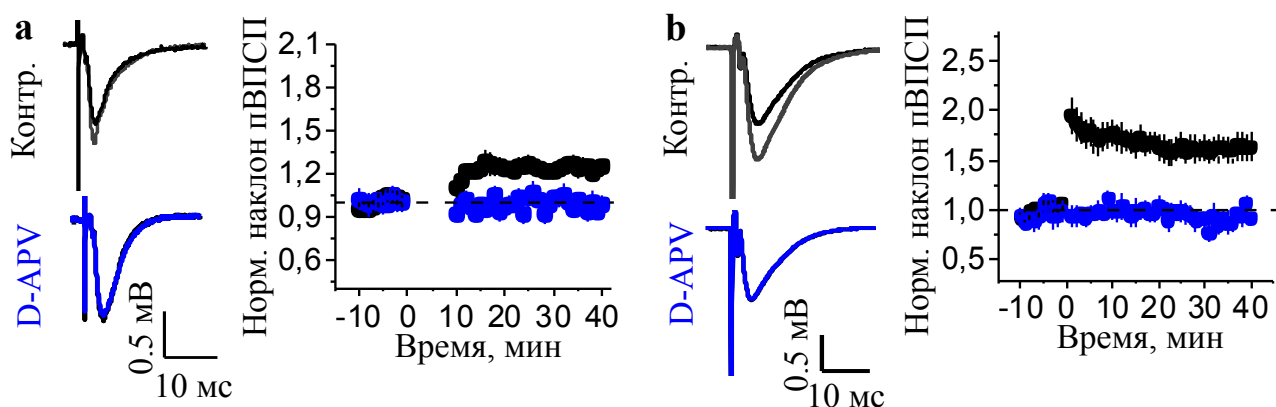


Рис. 1 Запись ДВП в контроле и в присутствии D-APV; а – STDP протокол возникает в; b - nonSTDP протокол.

2.1.2. Роль NMDA рецепторов в накоплении K^+ в синаптическом пространстве

Проводилась запись K^+ тока в астроцитах при стимуляции КШ и АД отдельно и парно. Сравнивались величина ответов, вызываемых парной стимуляцией и арифметической суммы на отдельную стимуляцию в контроле и при блокировании NMDA рецепторов с помощью D-APV (50 мкМ). Оказалось, что при блокировании NMDA рецепторов нелинейного увеличения K^+ тока в астроцитах не происходит (Рис. 2,а), указывая, что активация NMDA рецепторов приводит к значительному увеличению K^+ в синаптической щели, который может деполяризовать пресинаптическое окончание и захватываться астроцитами.

2.1.3. Роль NMDA рецепторов и выходящего через них K^+ на потенциацию ВПС

Запись ВПС в условиях стимуляции КШ 5 стимулов, 50 имп/с, с различными внутриклеточными растворами показала, что замена K^+ на NMDG $^+$ приводит к снижению потенциации ВПС (Рис. 2,б). Результат указывает на необходимость K^+ , выходящего из постсинапса, для потенциации высвобождения нейротрансмиттера. Также блокирование NMDA рецепторов с

помощью iMK801 приводит к снижению потенциации ВПСП (Рис. 2,b), указывая на NMDA рецепторы как на источник K^+ , необходимого для потенциации ВПСП.

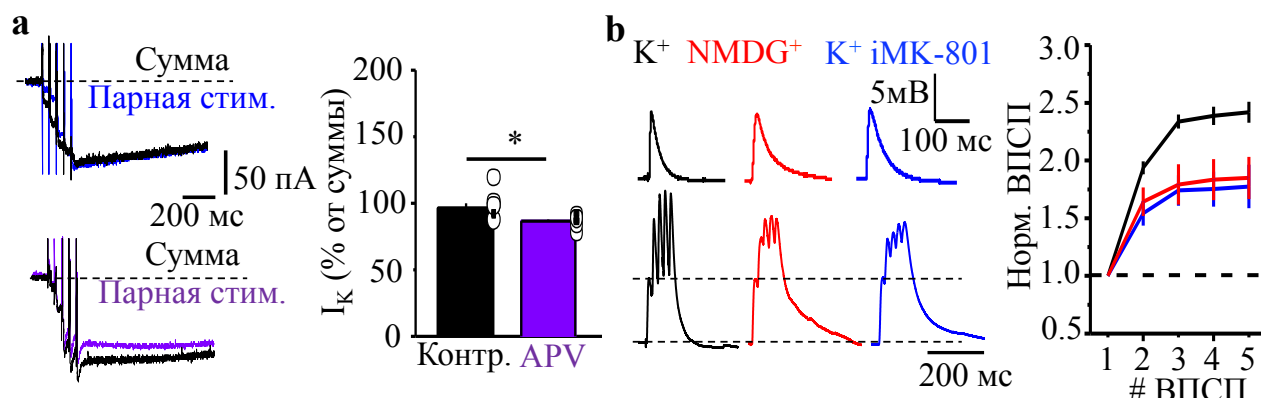


Рис. 2 NMDA-зависимая модуляция высвобождения нейротрансмиттера. а – K^+ ток в астроците при парной стимуляции КШ и АД в контроле и с D-APV; б – потенцияция ВПСП с растворами на основе K^+ , NMDG $^+$, и K^+ с iMK801.

2.2. Изучение Ca^{2+} сигнализации в астроцитах в условиях синаптической активации

2.2.1. Воздействие глутамата высвобожденного при фотостимуляции на распределение Ca^{2+} сигналов в астроцитах

Сравнение Ca^{2+} активности в астроцитах экспрессирующих Ca^{2+} индикатор GCaMP2 (Рис. 3, а) в контроле и при фотостимуляции связанным глутаматом показало, что частота Ca^{2+} событий увеличивается, но уменьшается α максимальной площади (S_{max}) Ca^{2+} событий (Рис. 3, б). α длительности Ca^{2+} событий в астроцитах при фотостимуляции достоверно не отличалась от контроля. Данные результаты свидетельствуют, что астроцитарная Ca^{2+} активность способна изменяться в присутствии глутамата.

2.2.2. Воздействие глутамата высвобожденного при электрической стимуляции на распределение Ca^{2+} сигналов в астроцитах

Контроль сравнивался с электрической стимуляцией КШ с частотой 0,2 имп/с. При этом произошло уменьшение α для S_{max} (Рис. 4, а), но достоверных изменений частоты и α длительности не наблюдалось. Это означает, что

астроцитарные Ca^{2+} события зависят не только от присутствия глутамата, но и от синаптического высвобождения глутамата и при этом новые события не возникают.

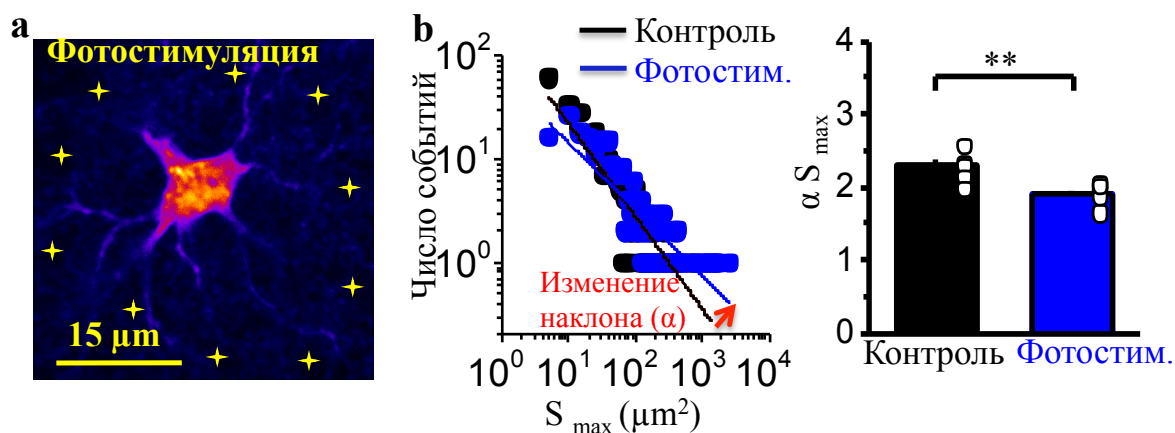


Рис. 3 Анализ Ca^{2+} событий в астроцитах. а – астроцит экспрессирующий GCaMP2; б – S_{\max} Ca^{2+} событий в контроле и при фотостимуляции.

2.2.3. Изучение роли mGluRs в генерации Ca^{2+} сигналов в астроцитах

Для выявления определенного типа рецепторов, ответственных за изменения Ca^{2+} активности в астроцитах при синаптической активации был протестирован наиболее вероятный кандидат - метаботропные рецепторы глутамата (mGluRs). Сравнивалась Ca^{2+} активность в астроцитах в контроле и в присутствии блокатора mGluRs – (S)-MCPG 600 мкМ. В результате произошло увеличению значения α для S_{\max} (Рис. 4, б), что говорит об уменьшении вклада в распределение событий большого размера. При этом не произошло достоверного изменения α для длительности и частоты событий. Эти эксперименты подтверждают важную роль активации mGluRs в генерации Ca^{2+} событий в астроцитах.

2.2.4. Изучение роли mGluRs в генерации Ca^{2+} сигналов в астроцитах при синаптической активации

Далее была изучена Ca^{2+} активность в астроцитах при блокировании mGluRs и электрической стимуляции. В присутствии MCPG и при

электрической стимуляции с MCPG α для S_{\max} (Рис. 4, с), α для длительности и частота событий достоверно не изменяются. Это указывает, что при синаптической активации происходит активация mGluR, что влияет на свойства Ca^{2+} событий в астроцитах.

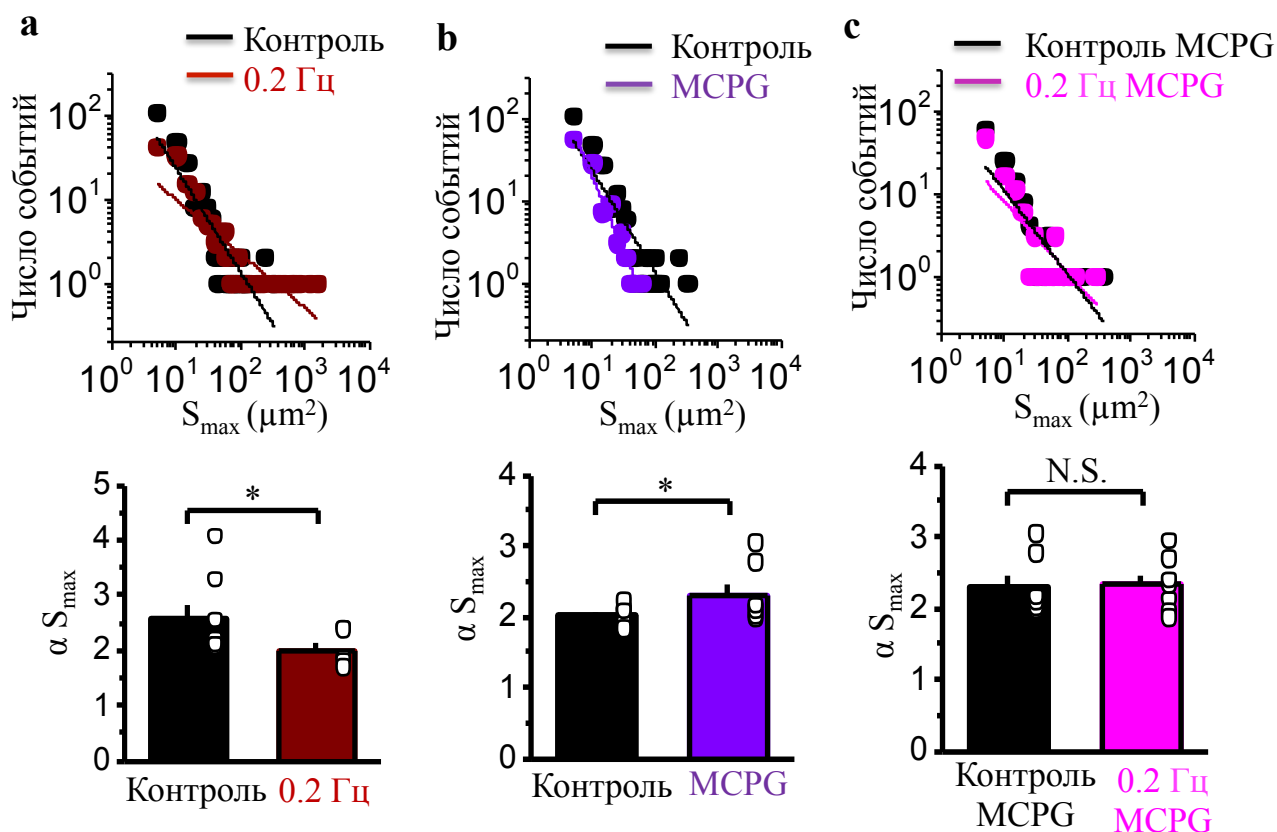


Рис. 4 Анализ Ca^{2+} событий в астроцитах. На верхних панелях представлены распределения αS_{\max} , на нижних - средние значения; а - S_{\max} Ca^{2+} событий в контроле и при электрической стимуляции 0,2 имп/с; б - S_{\max} Ca^{2+} событий в контроле и при блокировании mGluR; в - S_{\max} Ca^{2+} событий при блокировании mGluRs и электрической стимуляции 0,2 имп/с.

2.2.5. Воздействие низкочастотной электрической стимуляции на распределение Ca^{2+} сигналов в астроцита

Низкочастотная стимуляция приводит к увеличению α для S_{\max} по сравнению с контролем, но не вызывает достоверных изменений частоты и α длительности по сравнению с контролем. Данный результат свидетельствует, что протокол стимуляции долговременной депрессии приводит к снижению

Ca^{2+} активности в астроцитах и уменьшению вклада событий с большой площадью..

2.3. Роль внеклеточного матрикса (ВКМ) в синаптической передаче и пластичности в гиппокампе

2.3.2. Влияние ХСПГ на долговременную потенциацию

Сравнивалось возникновение ДВП в контроле и после обработки ХАВС после пяти повторений тетанической стимуляции КШ (**Рис. 5, а**). Уровень ДВП после ХАВС был значительно ниже чем контроле (**Рис. 5, б**). При тетанической стимуляции наклон ВПСП и количество возникающих ПД снижается после обработки ХАВС в сравнении с контролем. Данный результат может свидетельствовать, о том, что нарушен механизм возникновения ДВП.

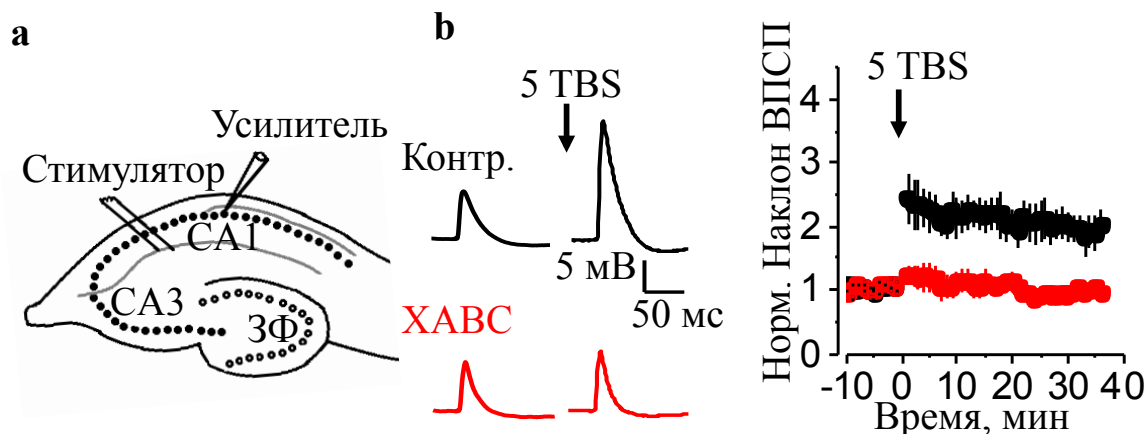


Рис. 5 Тетаническая стимуляция КШ (5 повторений) для инициации ДВП; а –схема расположения электродов; б –ДВП не возникает после ХАВС.

2.3.3. Влияние ХСПГ на тормозную синаптическую передачу

Коэффициент парной стимуляции (КПС) тормозных токов с межстимульным интервалом 50 мс после обработки ХАВС достоверно не отличается от контроля (**Рис. 6,а**). Частота и амплитуда спонтанных и миниатюрных тормозных постсинаптических токов (сТПСТ и мТПСТ соответственно) после обработки ХАВС также достоверно не отличается от контроля (**Рис. 6,б**). Также было показано, что торможение не изменилось при тетанической стимуляции (5 повторений) после удаления ВКМ.

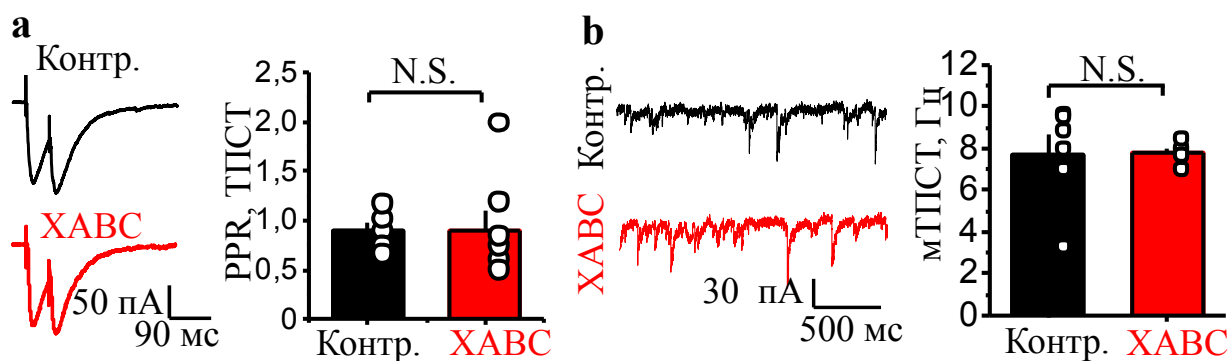


Рис. 6 Тормозная синаптическая передача после удаления ХСПГ; а – КПС тормозных токов; б – мТПСТ в контроле и после удаления ХСПГ.

Средняя амплитуда ответов и амплитуда пачечных ответов после высокочастотной стимуляции для последних 5 мин записи достоверно не отличаются между контролем и после ХАВС. Таким образом спонтанная и вызванная высокочастотной стимуляцией тормозная синаптическая передача не изменяется после удаления ХСПГ.

2.3.4. Влияние ХСПГ на соотношение возбуждения и торможения и на тоническую ГАМКергическую проводимость

Сравнение соотношения амплитуды и площади ВПСТ и ТПСТ не показало достоверных различий между контролем и ХАВС. Также не произошло значительного изменения тока фиксации (тонического тока) в контроле и ХАВС. Данные результаты говорят о том, что соотношения возбуждения и торможения и базового тонического торможения не происходит после удаления ХСПГ.

2.3.5. Влияние ХСПГ на возбуждающую синаптическую передачу

Изучение возбуждающей синаптической передачи показало, что после обработки ХАВС КПС достоверно не изменяется. Также не изменяется частота миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ) и частота NMDA рецептор-опосредованных ВПСР после обработки ХАВС (Рис. 7,а). Таким образом вероятность высвобождения глутамата в контроле и после ХАВС не отличается.

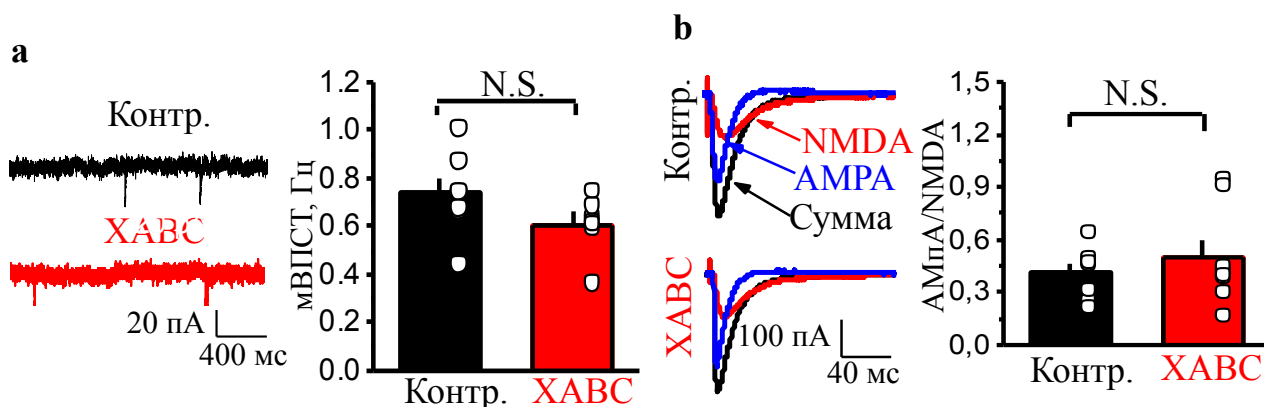


Рис. 7 Возбуждающая синаптическая передача после удаления ХСПГ; а – мВПСТ в контроле и после ХАВС; б – соотношение AMPA/NMDA токов.

Соотношения NMDA/AMPA токов в безмагниевой среде не изменилось после обработки ХАВС по сравнению с контролем (**Рис. 7, б**). Что означает, что возбуждающая синаптическая передача не изменилась после удаления ВКМ.

3.6. Влияние удаления ХСПГ на парную депрессию AMPA токов

Изучение парной депрессии AMPA токов на срезах, инкубированных в бафиломицине А1 (4μМ) (блокатор протонной АТФ-азы), не показало достоверных различий между контролем и обработкой ХАВС. Таким образом свойства активации AMPA рецепторов не изменились после удаления ХСПГ.

3.7. Влияние ХСПГ на возбудимость CA1 пирамидных нейронов и параметры потенциалов действия

Изменение возбудимости нейронов показало, что после обработки ХАВС нейроны генерировали значительно меньшее число ПД по сравнению с контролем в ответ на одну и ту же величину подаваемого тока (**Рис. 8, а**). При этом порог генерации и полуширина ПД в контроле и после обработки ХАВС достоверно не изменились. Входное сопротивление также не изменилось. Однако наблюдалось увеличение постгиперполяризации после деполяризующих ступенек, после обработки ХАВС по сравнению с контролем (**Рис. 8, б**). При блокировании AMPA, NMDA и ГАМК_A рецепторов различия между контролем и ХАВС сохранялись. Также не произошло достоверных изменений тока через h-каналы при удалении ХСПГ. Показано что ВК тип

каналов не вовлечен в снижение возбудимости, т.к. при их блокировании паксилином 5мкМ возбудимость после ХАВС не восстанавливалась до контрольного уровня.

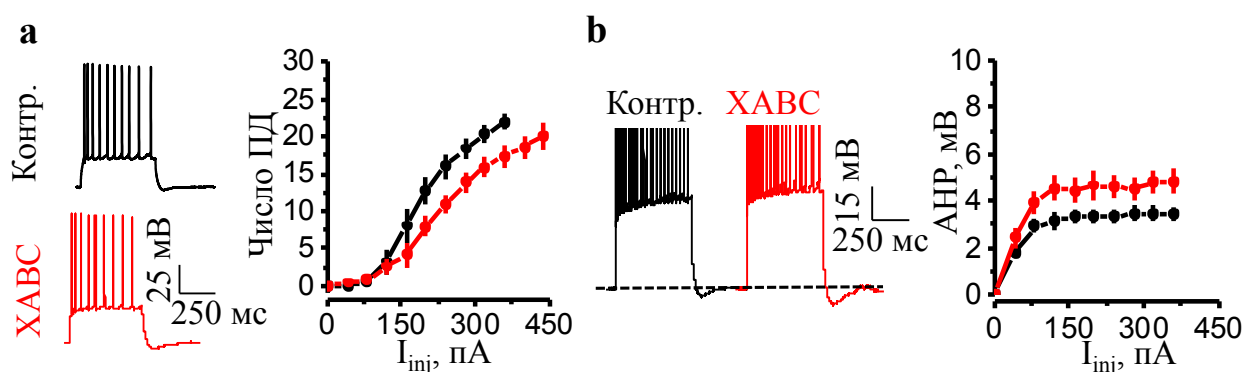


Рис. 8. Возбудимость пирамидных нейронов области CA1; а – снижение возбудимости после обработки ХАВС; б – увеличение послеберстовой гиперполяризации после обработки ХАВС.

3.8. Влияние ХСПГ на возбудимость CA1 пирамидных нейронов при блокировании SK каналов

Добавление апамина, блокатора SK каналов (100 нМ), вызвало повышение возбудимости в срезах при удалении ХСПГ до уровня контроля (Рис. 9, а). Также при блокировании SK каналов разница в амплитуде послеберстовой гиперполяризации между контролем и удалением ХСПГ исчезала (Рис. 9, б). Таким образом, удаление ХСПГ приводит к увеличению активации SK каналов и снижению возбудимости нейронов.

2.3.9. Влияние удаления ХСПГ на ток через SK каналы

Ток, опосредованный SK каналами при подаче деполяризующих мембрану до 0 мВ ступенек тока длительностью 500 мс, увеличивался после обработки ХАВС в сравнении с контролем (Рис. 10, а). Амплитуда остальных кальций-зависимых K⁺ токов не изменялась после удаления ХСПГ (Рис. 10, б). Таким образом прямое измерение тока SK каналов подтверждает его увеличение после удаления ХСПГ.

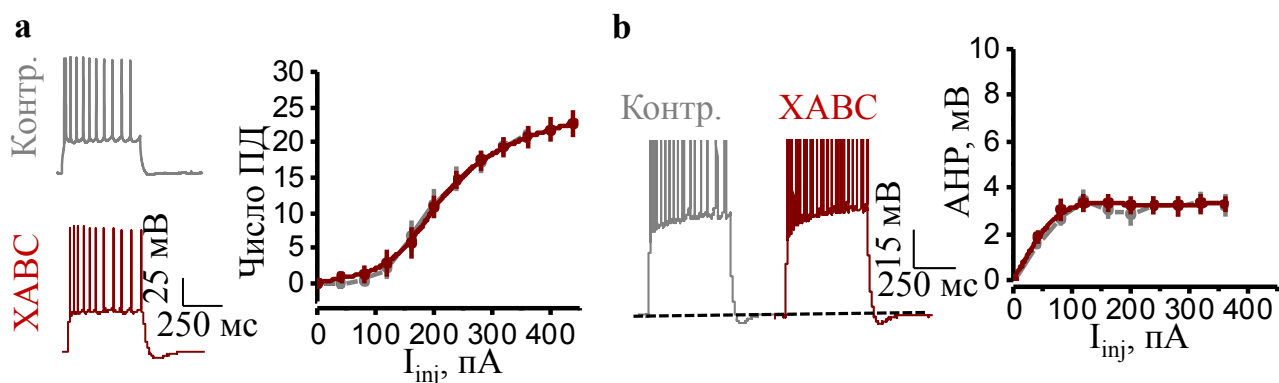


Рис. 9 Возбудимость пирамидных CA1 нейронов в присутствии апамина – блокатора SK каналов; а – снижение возбудимости после удаления ХСПГ; б – увеличение послеберстовой гиперполяризации после удаления ХСПГ.

2.3.10. Влияние активации SK каналов на NMDA-рецептор-опосредованного тока при удалении ХСПГ.

Соотношение амплитуд фармакологически выделенных $NMDA$ ВПСТ и $NMDA$ ВПСТ при блокировании SK каналов апамином, достоверно не различалось в контроле и после ХАВС. Это означает, что активация NMDA рецепторов не меняется после удаления ХСПГ.

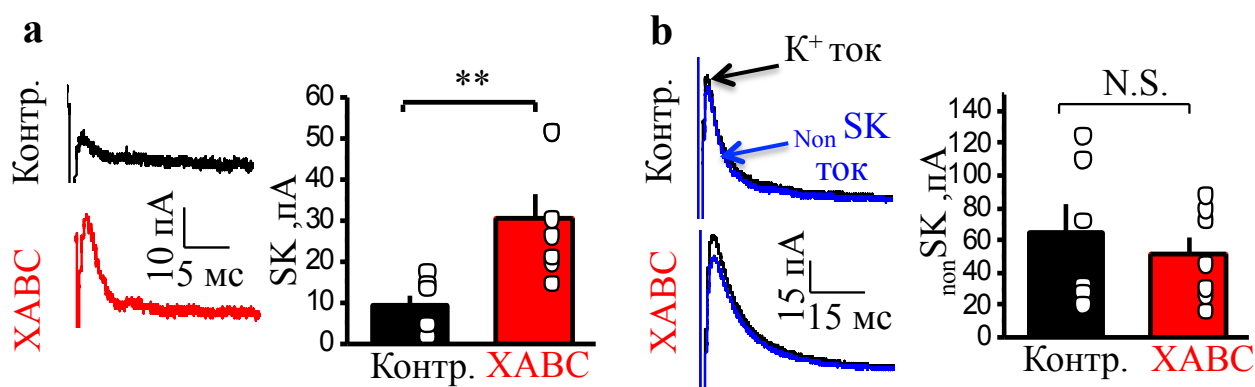


Рис. 10 запись K^+ токов при деполяризации до 0 мВ в контроле и после удаления ХСПГ; а - SK ток; б - $nonSK$ ток.

2.3.11. Влияние ХСПГ на долговременную потенцию при блокировании SK каналов

Уровень ДВП в присутствии блокатора SK каналов апамина при обработке ХАВС стал выше чем в контроле (Рис. 11, а). Это дает основание

думать, что ДВП не только восстанавливается, но существует возможность потенциации, опосредованной активацией ROCK-киназы.

2.3.12. Влияние ХСПГ на долговременную потенцию при блокировании SK каналов и ROCK- киназы

Уровень ДВП в присутствии апамина и ингибитора ROCK-киназы Y-27632 (10 мкМ), ответственной за перестройку цитоскелета шипиков достоверное не различался в контроле и при обработке ХАВС (Рис. 11, b), доказывая возможность потенциации, связанной с активацией ROCK-киназа зависимого пути.

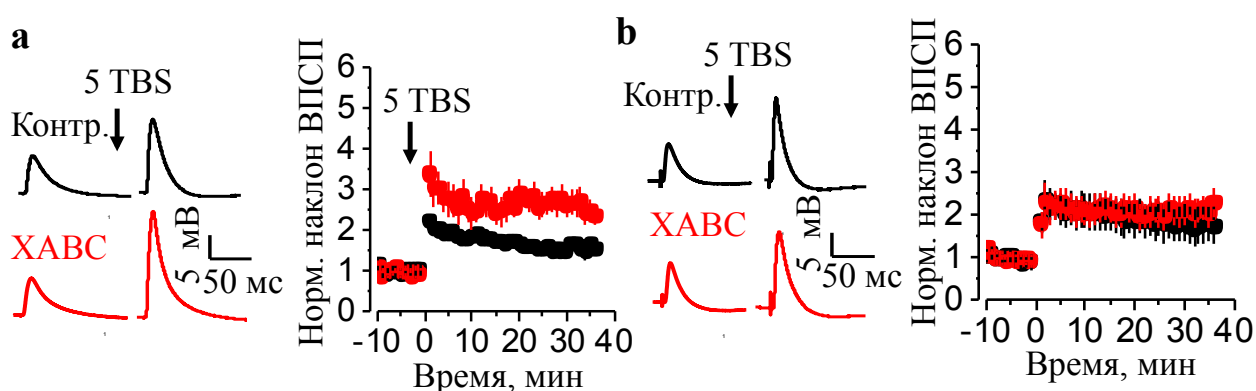


Рис. 11 Тетаническая стимуляция КШ (5 повторений) для инициации ДВП; а – в присутствии апамина 100 нМ блокатора SK каналов; b – в присутствии апамина и блокатора ROCK- киназы Y-27632 10 мкМ.

2.3.13. Влияние ХСПГ на Ca^{2+} динамику в астроцитах

Изучение распределения Ca^{2+} событий в астроцитах показало, что частота Ca^{2+} событий в контроле и после ХАВС не изменяется, а также не изменяется α для S_{max} , в то время как происходит увеличение длительности Ca^{2+} событий. Это может указывать на изменение свойств возникновения и распространения Ca^{2+} сигналов в астроцитах при удалении ХСПГ.

Результаты и обсуждения

Полученные результаты хорошо согласуются друг с другом и свидетельствуют, что синаптическая передача – это сложный процесс, который регулируется сложным взаимодействием пре-, постсинаптического окончаний,

глии и ВКМ. Таким образом синапс нужно рассматривать как многокомпонентную систему включающую не только взаимодействие пре- и постсинаптического окончаний, но также взаимное влияние нейронов, глиальных клеток и ВКМ.

Результаты работы подтверждают, что модуляция высвобождения нейротрансмиттера осуществляется увеличением K^+ , вытекающего при активации синаптических NMDA рецепторов, приводя к потенцированию пресинапса и повышению вероятности высвобождения нейротрансмиттера. Таким образом локальные изменения ионных концентраций могут выполнять роль обратной связи, регулирующей синаптическую передачу.

Применение нового метода анализа Ca^{2+} активности на соме и в отростках астроцита, показало способность астроцитов генерировать Ca^{2+} сигналы в ответ на синаптическую активацию. В работе было продемонстрировано, что не только присутствие глутамата влияет на Ca^{2+} активность в астроцитах, но и присутствие глутамата, высвобожденного при синаптической активации. Это влияние опосредовано активацией метаботропных рецепторов глутамата на астроцитарной мембране. Таким образом было показано наличие зависимости Ca^{2+} активности в астроцитах от синаптической активации, что является важным условием формирования обратной связи между нейронами и астроцитами, необходимой для регуляции синаптической передачи.

Изучение роли ВКМ в синаптической передаче показало наличие сложного взаимодействия между ними посредством двух механизмов влияющих на долговременную потенцию. Во-первых, ВКМ регулирует возбудимость нейронов и уровень потенции через активность SK каналов. Во-вторых, ВКМ связан с регуляцией перестройки цитоскелета, опосредованной активацией ROCK- киназы. При этом ВКМ не меняет базовых свойств глутаматергической и ГАМКергической синаптических передач. Кроме того ВКМ влияет на свойства Ca^{2+} событий в астроцитах, приводя к

увеличению их длительности, что также может иметь важное значение для понимания роли ВКМ в регуляции нейрон-глиального взаимодействия.

Данная работа позволила заполнить многие пробелы знаний о взаимодействии элементов синапса как многокомпонентной системы. Понимание взаимодействия пре-, постсинаптического окончаний, глии и ВКМ может играть важную роль в ряде физиологических процессов, участвующих в обеспечении эффективной работы нервной системы.

Выводы и основные результаты работы:

1. Выход K^+ в синаптическую щель при активации NMDA рецепторов потенцирует высвобождение нейротрансмиттера.
2. Синаптически высвобождаемый глутамат воздействует на метаботропные рецепторы астроцитов, приводя к увеличению площади Ca^{2+} событий, не влияя на их частоту.
3. Снижение ДВП при удалении ВКМ вызвано снижением возбудимости нейронов, опосредованное увеличением тока через SK каналы.
4. Удаление ВКМ приводит к возникновению потенциации через ROCK-киназа зависимый путь, подавляемой снижением возбудимости.
5. Удаление ВКМ вызывает увеличение длительности Ca^{2+} событий в астроцитах, не влияя на их максимальную площадь и частоту.

Публикации автора по теме диссертации.

В журналах из списка периодических изданий рекомендованных ВАК:

1. Danielyan A., Wu Y. W., Shih P. Y. **Dembitskaya Y**, Foi A., Semyanov A. Denoising of two-photon images with block-matching 3D filtering. // Methods, - T.68. - Глава 2. - С. 308-316. - 2014.
2. Shih P.-Y., Savtchenko L.P., Kamasawa N., **Dembitskaya Y.**, McHugh T.J., Rusakov D., Shigemoto R., and Semyanov A. Retrograde synaptic signaling

mediated by K^+ efflux through postsynaptic NMDA receptors. // Cell Reports, - 2012. - T.5. - Issue 4. - С. 941–951, -2013.

3. Wu Y.-W., Tang X., Arizono M., Bannai H., Shih P.-Y., **Dembitskaya Y.**, Kazantsev V., Tanaka M., Itohara S., Mikoshiba K., Semyanov A. Spatiotemporal Calcium Dynamics in Single Astrocytes and Its Modulation by Neuronal Activity. // Cell Calcium. - T.55. - Глава 2. - С. 119-129. - 2014.

Публикации в других изданиях (учебно-методические пособия):

1. **Дембицкая Ю.В.**, Лебедева А.В., Тюрикова О. В., Семьянов А.В. Методика регистрации электрической активности нейронов методом «патч-кламп». // Издательство ННГУ им. Н.И. Лобачевского, - Нижний Новгород, - 2012. - 27с.

2. **Дембицкая Ю.В.**, Семьянов А.В. Методика настраивания дифференциального интерференционного контраста на микроскопе Olympus BX51WI. // Издательство ННГУ им. Н.И. Лобачевского, - Нижний Новгород, - 2012. - 14с.

3. Тюрикова О.В., **Дембицкая Ю.В.**, Лебедева А.В., Доронин М.С., Семьянов А.В. Основы метода ПЦР и его применимость в нейробиологии. // Издательство ННГУ им. Н.И. Лобачевского, - Нижний Новгород. - 2014. - 20с.

Труды конференций и симпозиумов:

1. **Dembitskaya Y.**, Song I., Dityatev A., Semyanov A. Chondroitin sulfates proteoglycans regulate excitability and synaptic transmission of CA1 pyramidal neurons. // "BSI Retreat 2012". - RIKEN, Karuizawa, Japan. - 2012, - Ноябрь 12-13.

2. **Dembitskaya Y.**, Song I., Dityatev A., Semyanov A. The Role of extracellular matrix in regulation of excitability and synaptic transmission in CA1 pyramidal neurons of hippocampus. // Международный симпозиум «Прогресс и перспективы исследований внеклеточного матрикса мозга». - ННГУ им. Н.И. Лобачевского, - Нижний Новгород, Россия, - 2012, - 22 ноября.

3. Wu Y. W., Tang X., Arizono M., Bannai H., Shih P.Y., **Dembitskaya Y.**, Kazantsev V., Tanaka M., Itohara S., Mikoshiba K., Semyanov A. // Spatiotemporal

dynamics of Ca^{2+} signaling in single hippocampal astrocytes. - Society for Neuroscience meeting. - San Diego, California, USA, - 2013, - 9-13 ноября.

4. **Dembitskaya Y.**, Song I., Doronin M., Dityatev A., Semyanov A. Effect of extracellular matrix removal on synaptic signalling and plasticity in hippocampal slices. // Международный симпозиум «Прогресс и перспективы исследований внеклеточного матрикса мозга». - ННГУ им. Н.И. Лобачевского, - Нижний Новгород, Россия, - 2013, - 20-21 ноября.

5. **Dembitskaya Y.**, Song I., Doronin M., Dityatev A., Semyanov A. Effects of enzymatic removal of chondroitin sulfates on neural excitability and synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. // 9th FENS Forum of Neuroscience. - Milan, Italy, - 2014, - 5-9 июля.

6. **Dembitskaya Y.**, Song I., Doronin M., Dityatev A., Semyanov A. Effects of enzymatic removal of chondroitin sulfates on neural excitability and synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region // OIST Computational Neuroscience Course 2014, Okinawa, Japan, - 2014, - 16 Июня- 3 Июля.

7. **Dembitskaya Y.**, Song I., Doronin M., Dityatev A., Semyanov A. Enzymatic removal of chondroitin sulfates modulates neuronal excitability and synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region // Society for Neuroscience meeting. - Washington, Washington DC, USA, - 2014, - 15-19 ноября.

8. **Dembitskaya Y.**, Wu Y.-W., Brenner T., Semyanov A. Tonic GABA_A conductance differentially regulates different types of LTP. // Society for Neuroscience meeting. - Washington, Washington DC, USA, - 2014, - 15-19 ноября.

9. **Dembitskaya Y.**, Song I., Doronin M., Dityatev A., Semyanov A. Effects of enzymatic removal of chondroitin sulfates on neural excitability and synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. // Международный симпозиум «Прогресс и перспективы исследований внеклеточного матрикса мозга». - ННГУ им. Н.И. Лобачевского, - Нижний Новгород, Россия, - 2014, - 1-2 декабря.